Archive of SID

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون تیپ‌های مختلف توتون با استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP

سیده فاطمه حسنی تسیه[۱]، حبیب الله سمیع‌زاده لاهیجی[۲] و مرداویج شعاعی دیلمی[۳]

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسوول: hassani_fateme_guilan@yahoo.com)
۲- دانشیار، دانشگاه گیلان
۳- مربی، مرکز تحقیقات توتون گیلان
تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۸

چکیده

در این مطالعه به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ از ژرم‌پلاسم تیپ‌های مختلف توتون شامل گرمخانه‌ای، بارلی و شرقی، از ۲۰ ترکیب آغازگری IRAP و REMAP استفاده شد که از بین این آغازگرها، ۵ آغازگر IRAP و ۹ آغازگر REMAP قادر به تولید الگوی نواری، با وضوح و چندشکلی بالا بودند و در مجموع ۱۸۸ مکان را تکثیر کردند که از این تعداد ۱۵۳ مکان، چندشکل بودند. آغازگر RTR-10 با ۲۲ نوار و RTR-1 با ۱۶ نوار، بیشترین و آغازگر UBC817+RTR1 با ۴ نوار، کمترین تعداد مکان‌های چند شکل را تکثیر کردند. میزان اطلاعات چندشکل نشانگرها بین ۰/۱۶ تا ۰/۳۳ و شاخص نشانگر از ۰/۳۴ تا ۶/۲۵ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه را در پنج گروه قرار داد، که گروه اول شامل تیپ بارلی، گروه دوم شامل تیپ گرمخانه‌ای و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ شامل ژنوتیپ‌های شرقی شدند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۷۳/۳ درصد تایید شد.

واژه‌های کلیدی: رتروترانسپوزون، ضریب تشابه انطباق ساده، میزان اطلاعات چندشکل

مقدمه

توتون یکی از مهم‌ترین محصولات تجاری جهان است که به دلیل اهمیت اقتصادی و ارزش آن در پژوهش‌های بیولوژیکی، تحقیقات متعددی برای بررسی منشا تکاملی، تنوع ژنتیکی و ساختار ژنومی آن انجام شده است (۱۴). اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها، برای انتخاب والدین، جهت انجام تلاقی‌های کارا و اتخاذ روش اصلاحی مناسب، ضروری است و نشانگرهای مولکولی ابزارهایی توانمند برای شناسایی ارقام، بررسی تکامل گونه، بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها هستند (۱۶). اخیراً نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها توسعه پیدا کرده‌اند که ویژگی‌هایی از قبیل فعالیت درجی، ثبات، پراکندگی، ساختار حفاظت‌شده، موتیف‌های پشت سر هم و تعداد نسخه بالا، آنها را به‌عنوان سیستم‌های نشانگری مناسب و کارا، به‌خصوص برای بررسی تنوع ژنتیکی و تکاملی درون و بین گونه‌ای معرفی کرده است (۵). شناسایی رتروترانسپوزون‌ها به وسیله توالی‌یابی ژنوم و یا به وسیله روش‌های مبتنی بر PCR نشان داد که آن‌ها تنوع بزرگی در بین گونه‌های گیاهی و نیز در داخل ژنوم یک گیاه دارند. رتروترانسپوزون‌های *Tnd-1*، *Tnt1* و *Tto1* در ژنوم توتون نیز چندشکلی زیادی را در گونه‌های مختلف آشکار ساخته‌اند (۶).

تجزیه خوشه‌ای ۲۸ ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگرهای مولکولی IRAP و ISSR نشان داد که این دو روش جهت مطالعه تنوع ژنتیکی توتون مناسب بودند و نشانگر IRAP ضریب فاصله ژنتیکی بالاتر، تکرارپذیری و چندشکلی بیشتری نسبت به نشانگر ISSR نشان داد. (۱۸). بررسی تنوع ژنتیکی ۱۱۸ ژنوتیپ از ژرم‌پلاسم تیپ‌های مختلف توتون شامل گرمخانه‌ای، بارلی، شرقی و توتون‌های وحشی با نشانگرهای مولکولی ISSR و IRAP نشان داد که تنوع ژنتیکی پایینی در داخل جمعیت و بین تیپ‌های ژنوتیپ‌های زراعی توتون وجود داشت، ولی فاصله ژنتیکی و هتروزیگوتی در میان ژنوتیپ‌های وحشی، بیشتر از ژنوتیپ‌های زراعی بود (۳). محسن‌زاده و همکاران (۸) اظهار داشتند که نشانگرهای ISSR و IRAP، نشانگرهایی کارا جهت تعیین تنوع ژنتیکی توتون می‌باشند که در بررسی آنها، ۴۹ ژنوتیپ گرمخانه‌ای بر اساس تجزیه خوشه‌ای در ۵ گروه قرار گرفتند. نتایج تحقیقات مختلف، حاکی از تنوع ژنتیکی محدود بین تیپ‌های زراعی توتون می‌باشد و بیشتر چندشکلی ژنتیکی موجود، بین گونه‌های وحشی و زراعی توتون مشاهده شده است (۲۲،۱۷،۱۴).

www.SID.ir

Archive of SID

هرچند بررسی‌های زیادی در رابطه با تنوع ژنتیکی توتون صورت گرفته است ولی با توجه به اینکه هر نشانگر تنها قسمتی از سطح ژنوم را پوشش می‌دهد، جهت دستیابی به اطلاعات دقیق و مشخص در مورد روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های توتون، باید از نشانگرهای مختلف جهت پوشش مناسب سطح ژنوم استفاده گردد، لذا در این تحقیق جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ از ژرم‌پلاسم تیپ‌های مختلف توتون شامل بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی از نشانگرهای مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزونی، IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) و REMAP (retrotransposon-microsatellite ampliphied polymorphism)، استفاده شد تا علاوه برتعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم، آغازگرهایی که کارایی بالا در تمایز ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه در این تحقیق را داشتند، جهت استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون معرفی گردند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بذر ۴۵ ژنوتیپ از تیپ‌های مختلف توتون (جدول ۱)، شامل توتون‌های گرمخانه‌ای، بارلی و شرقی از مرکز تحقیقات توتون رشت تهیه شد. برای تهیه نمونه‌های برگی جهت استخراج DNA، نمونه‌های بذر در گلخانه موسسه تحقیقات توتون رشت کشت شدند. نمونه‌گیری از برگ‌های توتون در مرحله ۳ تا ۴ برگی انجام شد. این نمونه‌ها پس از شماره‌گذاری و بسته‌بندی در ورقه‌های آلومینیومی، در نیتروژن مایع، منجمد و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۷۰- نگه‌داری شدند. DNA ژنومی نمونه برگ‌های تثبیت شده در ازت مایع با استفاده از روش دوئل و دوئل (۴) با اندکی تغییرات استخراج شد. کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین گردید.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه

ردیف	ژنوتیپ‌های بارلی	منشا جغرافیایی	ردیف	ژنوتیپ‌های گرمخانه‌ای	منشا جغرافیایی	ردیف	ژنوتیپ‌های شرقی	منشا جغرافیایی
۱	Burley W.R 14	USA	۱۶	Erzegovina	Erzegovin	۳۱	B 12-2	Iran
۲	Burley white IV Geel	USA	۱۷	K. S1. E.	USA	۳۲	B 16-10	Iran
۳	Burley 7022	USA	۱۸	Pereg 234	Germany	۳۳	BS36	Greece
۴	Burley B5	Germany	۱۹	Perega	Germany	۳۴	Basma 178-2	Iran
۵	Burley pr-144	Germany	۲۰	Speight G. 28	USA	۳۵	Ch T 269-12	Iran
۶	Burley Ree103	USA	۲۱	N. 2	USA	۳۶	D-566	Iran
۷	Burley PMR	Switzerland	۲۲	Coker 298	USA	۳۷	F.K.40-1	Iran
۸	Burley semparant	Australia	۲۳	Bel 61-12	USA	۳۸	H-169	Iran
۹	Badisher Burley E	Germany	۲۴	Virgin aurea	USA	۳۹	Kromovgrad 42	Bulgaria
۱۰	Banket A1	Zimbabwe	۲۵	TL 13	USA	۴۰	Izmir	Turkey
۱۱	BB16A	France	۲۶	Deliot	Belgium	۴۱	Imine	Australia
۱۲	Burley 1	USA	۲۷	S. 392-35	Germany	۴۲	Mutant 4 (no4)	Iran
۱۳	Burley 151	USA	۲۸	Virginia A-mutant	Germany	۴۳	Sota 7644	Switzerland
۱۴	Burley 7	USA	۲۹	Harrison Speacial	USA	۴۴	Samatra	Belgium
۱۵	Burley A1	USA	۳۰	RH-211	USA	۴۵	B104-1	IRAN

در این تحقیق، در روش REMAP از ترکیبات مختلف ۱۲ آغازگر ISSR و ۵ آغازگر رتروترانسپوزونی استفاده شد (جدول ۲) که از مجموع ۱۵ ترکیب، ۹ ترکیب آغازگری دارای تکثیر مطلوب و قابل نمره‌دهی بودند و ۶ ترکیب آغازگری دیگر، الگوی نواری نامشخص تولید کردند. در روش IRAP، از ۵ آغازگر رتروترانسپوزونی استفاده شد (جدول ۲). تکثیر قطعات DNA با واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳۰ تا ۴۰ نانوگرم DNA الگو، بافر PCR با غلظت 1X، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۱ میلی‌مولار dNTP، ۰/۳ میکرومولار آغازگر و یک واحد آنزیم Taq پلی‌مراز انجام گرفت. واکنش‌های PCR با دستگاه ترموسایکلر Biometra، با برنامه PCR شامل مراحل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، در ادامه ۳۵ چرخه به صورت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه اتصال آغازگر در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (جدول ۲)، ۲ دقیقه مرحله توسعه رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک شدند. ژل‌ها پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه ژل داک، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

میزان اطلاعات چندشکل (PIC: Polymorphism Information Content) بر اساس رابطه ۱، نسبت چندگانه مؤثر (EMR: Effective Multiplex Ratio) که بیانگر تعداد جایگاه ژنی چندشکل موجود در یک ژرم‌پلاسم می‌باشد، با استفاده از رابطه ۲ و همچنین شاخص نشانگر (MI: Marker Index) با استفاده از رابطه ۳ برای کلیه آغازگرها محاسبه شد.

$$PIC = 1 - \sum_{I=1}^{n} p_I^2 \quad (۱)$$

$$EMR = N.\beta \quad (۲)$$

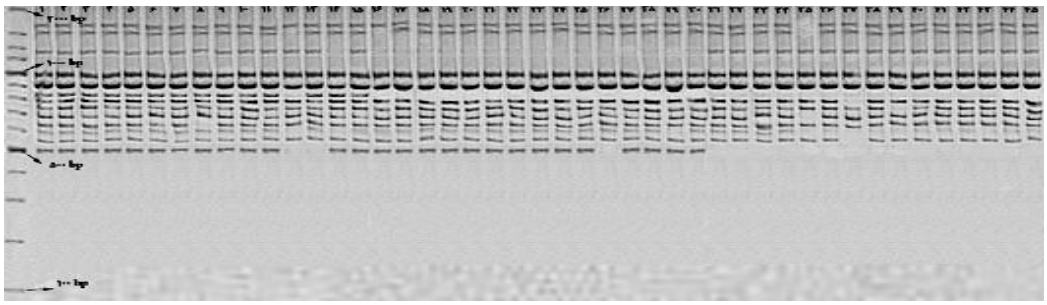
$$MI = PIC.N.\beta \quad (۳)$$

که در آنها PIC، میانگین میـزان اطلاعات چندشکل، N تعداد کـل نوارهـای چندشکل و β درصد چندشکلی (تعداد جایگاه‌های چندشکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه‌ها) برای هر آغازگر می‌باشد. MI علاوه بر مزایای شاخص PIC، تعداد کل نوار و نسبت چندشکلی را نیز در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید نوار بیشتر نشان می‌دهد (۱۳،۱). پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیکی بین تیپ‌ها (ضریب تمایز ژنی، جریان ژنی، تنوع ژنتیکی کل، تنوع ژنتیکی درون تیپ‌ها) و درون تیپ‌ها (شاخص شانون، تنوع ژنی نی) با استفاده از نرم‌افزار POPGEN نسخه ۱/۳۱ تعیین گردید (۲۱).

جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مـورد مطالعـه، تعیین تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنوتیپ‌ها ابتدا بر اساس روش‌های مختلف انجام و در نهایت بهترین گروه‌بندی بر اساس شاخص‌های آماری انتخاب گردید که بدین منظور از نرم‌افزار NTSYS استفاده شد (۱۵). همچنین بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها براساس تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenStat نسخه ۱۲ (۱۹) و تجزیه تابع تشخیص با نرم‌افزار SPSS 16.0 (۲) انجام شد.

نتایج و بحث

از ۲۰ آغازگر به‌کار رفته در این آزمایش، ۵ آغازگر IRAP و ۹ آغازگر REMAP الگوی نواری مشخص داشتند و در مجموع ۱۸۸ نوار نمره‌دهی شدند که ۱۵۳ نوار چندشکل بودند. تعداد نوارهای چندشکل از ۴ تا ۲۲ نوار برای هر آغازگر متغیربود (جدول ۲).



شکل ۱- الگوی نواری REMAP حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌های توتون (جدول ۱) با استفاده از آغازگرهای UBC826+RTR-8. اولین ستون سمت چپ نشانگر اندازه (Ladder) و شماره‌های ۱ الی ۷ مربوط به ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد.

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده، توالی، دمای اتصال، درصد چندشکلی، تعداد نوار و تعداد نوار چندشکل آنها

ردیف	نام آغازگر	دمای اتصال	درصد چندشکلی	تعداد نوار	تعداد نوار چندشکل	توالی (′۳-′۵)
۱	RTR-1	۶۱/۱۹	۸۰	۲۰	۱۶	TATGCTGACCAAGGTGGTAC
۲	RTR-2	۶۶/۰۹	۸۵/۷۱	۱۴	۱۲	AAGTTGTCTGAGGCTTATGTGACTT
۳	RTR-7	۶۸/۳۹	۸۵/۷۱	۱۴	۱۲	TCCGCTGTGCAGTAGTGTTTAGTG
۴	RTR-8	۶۴/۲۲	۸۴/۶۱	۱۳	۱۱	CTTACCTCTCCCATACATCACCA
۵	RTR-10	۶۲/۸۱	۹۱/۶۷	۲۴	۲۲	AACGTGTTAATGTCGCTTTGTC
۶	UBC811+RTR-1	۵۴/۲۵	۷۰/۵۹	۱۷	۱۲	GAGAGAGAGAGAGAGAC TATGCTGACCAAGGTGGTAC
۷	UBC813+RTR-10	۵۴/۵۵	۷۵	۸	۶	CTCTCTCTCTCTCTCTT AACGTGTTAATGTCGCTTTG
۸	UBC815+RTR-8	۵۵/۷۷	۸۷/۵	۸	۷	CTCTCTCTCTCTCTCTG CTTACCTCTCCCATACATCAC
۹	UBC817+RTR-1	۵۶/۴۱	۴۰	۱۰	۴	CACACACACACACACAA TATGCTGACCAAGGTGGTAC
۱۰	UBC823+RTR-8	۵۸/۳۷	۱۰۰	۱۱	۱۱	TCTCTCTCTCTCTCTCC CTTACCTCTCCCATACATCAC
۱۱	UBC823+RTR-10	۵۵/۶۷	۱۰۰	۱۳	۱۳	TCTCTCTCTCTCTCTCC AACGTGTTAATGTCGCTTTG
۱۲	UBC825+RTR-10	۵۷/۶۸	۸۷/۵	۱۶	۱۴	ACACACACACACACACT AACGTGTTAATGTCGCTTTG
۱۳	UBC826+RTR-1	۵۷/۴۸	۶۶/۶۷	۱۲	۸	ACACACACACACACACC TATGCTGACCAAGGTGGTAC
۱۴	UBC826+RTR-8	۵۹	۶۲/۵	۸	۵	ACACACACACACACACC CTTACCTCTCCCATACATCAC
کل			۸۱/۳۸	۱۸۸	۱۵۳	
میانگین			۷۹/۸۲	۱۳/۴۳	۱۰/۹۳	

www.SID.ir

Archive of SID

میزان اطلاعات چندشکل (PIC) هر آغازگر برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، هم‌چنین به‌طور جداگانه برای تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی محاسبه شد (جدول ۳). آغازگر RTR-8 دارای بیشترین مقدار PIC برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و تیپ بارلی به ترتیب ۰/۳۳ و ۰/۳۵ بود و آغازگر RTR-2 دارای بیشترین مقدار PIC برای تیپ‌های گرمخانه‌ای و شرقی به‌ترتیب ۰/۳۳ و ۰/۳۹ بود. این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرهای به کار رفته توانستند فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کنند که نشان‌دهنده سودمندی این آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی توتون می‌باشد و می‌توانند در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند. کمترین مقدار PIC نیز در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مربوط به آغازگر UBC813+RTR-10 به میزان ۰/۱۶ بود. میانگین این شاخص برای همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۰/۲۴ و برای تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی به ترتیب ۰/۲۲، ۰/۲۴ و ۰/۲۵ به دست آمد. محسن‌زاده و همکاران (۸) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی توتون‌های گرمخانه‌ای میزان PIC را بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۶ گزارش کردند. به‌منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان EMR برای آغازگر RTR-10 و کمترین میزان برای آغازگر UBC817+RTR1 بود (جدول ۳). محاسبه شاخص نشانگری (MI) برای هر کدام از آغازگرهای مورد استفاده (جدول ۳)، نشان داد که آغازگرهای RTR-10، RTR-2، RTR-8، UBC825+RTR-10 و RTR-1 به ترتیب ۶/۲۵، ۳/۱۹، ۳/۰۷ ، ۲/۹۴ و ۲/۸۱ دارای بیشترین شاخص نشانگری و کارایی بالایی در بروز چندشکلی بودند و کمترین مقدار مربوط به آغازگر UBC817+RTR-1 (۰/۳۴) بود، همچنین میانگین این شاخص ۲/۲۶ محاسبه شد.

جدول ۳- نسبت چندگانه موثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI)، تنوع ژنی نی، شاخص شانون و محتوای چندشکل نشانگرها (PIC) در جایگاه IRAP و REMAP در ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه

ردیف	نام آغازگر	EMR	MI	تنوع ژنی نی	شاخص شانون	PIC			
						کل	بارلی	گرمخانه‌ای	شرقی
۱	RTR-1	۱۲/۸	۲/۸۱	۰/۳۶	۰/۵۴	۰/۲۲	۰/۲	۰/۲۳	۰/۲۲
۲	RTR-2	۱۰/۲۹	۳/۱۹	۰/۴۴	۰/۶۳	۰/۳۱	۰/۲۲	۰/۳۳	۰/۳۹
۳	RTR-7	۱۰/۲۹	۲/۲۶	۰/۳۴	۰/۵۳	۰/۲۲	۰/۱۶	۰/۲۴	۰/۲۶
۴	RTR-8	۹/۳۱	۳/۰۷	۰/۴۲	۰/۶۱	۰/۳۳	۰/۳۵	۰/۲۷	۰/۳۶
۵	RTR-10	۲۰/۱۷	۶/۲۵	۰/۳۸	۰/۵۷	۰/۳۱	۰/۳۳	۰/۳۱	۰/۲۹
۶	UBC811+RTR-1	۸/۴۸	۱/۶۹	۰/۱۶	۰/۲۹	۰/۲	۰/۱۸	۰/۲۲	۰/۲۱
۷	UBC813+RTR-10	۴/۵	۰/۷۲	۰/۲۸	۰/۴۲	۰/۱۶	۰/۲۱	۰/۱۲	۰/۱۵
۸	UBC815+RTR-8	۶/۱۲	۱/۴۱	۰/۳۳	۰/۴۸	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۳۲	۰/۱۶
۹	UBC817+RTR-1	۱/۶	۰/۳۴	۰/۳۱	۰/۴۸	۰/۲۱	۰/۱۲	۰/۲۳	۰/۲۸
۱۰	UBC823+RTR-8	۱۱	۲/۴۲	۰/۳۷	۰/۵۴	۰/۲۲	۰/۲	۰/۱۸	۰/۲۸
۱۱	UBC823+RTR-10	۱۳	۲/۴۷	۰/۲۵	۰/۳۹	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۲۲	۰/۱۸
۱۲	UBC825+RTR-10	۱۲/۲۵	۲/۹۴	۰/۳۱	۰/۴۷	۰/۲۴	۰/۲۶	۰/۲۲	۰/۲۳
۱۳	UBC826+RTR-1	۵/۳۳	۱/۳۳	۰/۳۵	۰/۵۳	۰/۲۵	۰/۱۷	۰/۳	۰/۲۸
۱۴	UBC826+RTR-8	۳/۱۲	۰/۶۹	۰/۳	۰/۴۸	۰/۲۲	۰/۲۴	۰/۱۹	۰/۲۲
میانگین			۲/۲۶	۰/۳۴	۰/۵	۰/۲۴	۰/۲۲	۰/۲۴	۰/۲۵

میانگین شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و هر یک از تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی به تفکیک در جدول ۴ ارائه شده است. میانگین تنوع ژنی نی برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و برای تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی به ترتیب ۰/۳۴، ۰/۲۵، ۰/۱۸ و ۰/۲۵ و میانگین شاخص شانون آنها به ترتیب ۰/۵، ۰/۳۷، ۰/۲۶ و ۰/۳۷ محاسبه شد. نتایج نشان داد که تنوع ژنی درون تیپ گرمخانه‌ای کمتر از سایر تیپهای مورد مطالعه است. آغازگرهای RTR-2، RTR-8، RTR-10، RTR-1 و UBC823+RTR-8 نیز به ترتیب دارای بیشترین میزان تنوع ژنی نی و شاخص شانون بودند که نشان می‌دهد آغازگرهای فوق توانستند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کنند. آغازگر UBC811+RTR-1 نیز کمترین میزان تنوع ژنی و شاخص شانون را نشان داد (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مورد تنوع ژنتیکی کل و درون تیپ‌های توتون

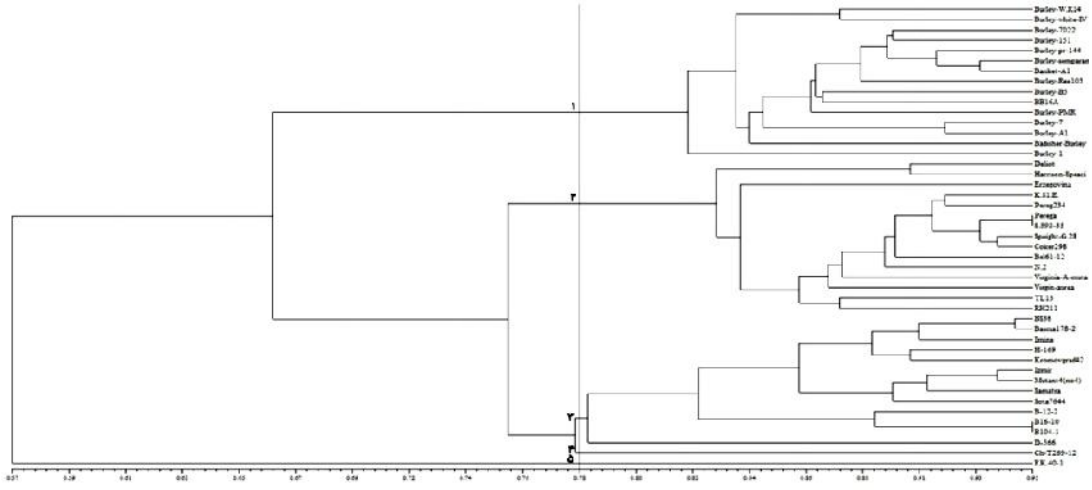
شاخص	کل	بارلی	گرمخانه‌ای	شرقی
تنوع ژنی نی	۰/۱۴ ±۰/۳۴	۰/۲۱ ±۰/۲۵	۰/۲ ±۰/۱۸	۰/۲ ±۰/۲۵
شاخص شانون	۰/۱۷ ±۰/۵	۰/۳ ±۰/۳۷	۰/۲۹ ±۰/۲۶	۰/۲۸ ±۰/۳۷

جهت بررسی روابط بین تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی، شاخص‌های مربوط به ساختار ژنتیکی بین تیپ‌ها محاسبه شدند (جدول ۵). تنوع ژنی کل با ۴۵ ژنوتیپ که حاصل جمع تنوع ژنی در داخل تیپ‌ها و تنوع ژنی بین تیپ‌ها می‌باشد (۱۱)، ۰/۳۴ برآورد شد. تنوع ژنی در داخل تیپ‌ها ۰/۲۳، ضریب تمایز ژنی بین تیپ‌ها ۰/۳۲ و جریان ژنی ۱/۰۴ محاسبه شد که بیانگر بالا بودن تبادل ژنی بین تیپ‌های مورد مطالعه در این بررسی بود. هچنین ضریب تمایز ژنی بین تیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که ۳۲ درصد از کل تنوع مشاهده شده ناشی از تنوع بین تیپ‌ها است و بیش از ۶۰ درصد تنوع کل ناشی از تنوع درون تیپ‌ها بوده است. این نتیجه با تحقیق یانگ و همکاران (۱۹)، هم‌خوانی داشت. آنها در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۱۸ ژنوتیپ از تیپ‌های مختلف توتون، مقدار ضریب تمایز ژنی را ۰/۳۱ گزارش کرده و تنوع کمی بین تیپ‌های مورد مطالعه مشاهده کردند.

جدول ۵- شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده در مورد تنوع بین تیپ‌های توتون

شاخص	مقدار محاسبه شده
تنوع ژنتیکی کل	۰/۳۴ ±۰/۰۲
تنوع ژنتیکی درون تیپ‌ها	۰/۲۳ ±۰/۰۲
ضریب تمایز ژنی	۰/۳۲
جریان ژنی	۱/۰۴

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس، نشان داد که گروه‌بندی براساس ضریب تشابه تطابق ساده با ضریب کوفنتیک ۰/۹۱، مناسب‌ترین روش جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از بین روش‌های مورد بررسی است. گروه‌بندی براساس ضریب تشابه تطابق ساده با ترسیم خط برش در فاصله ۰/۷۸، ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۵ گروه قرار داد (شکل ۲).



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای تیپ‌های مختلف توتون مورد مطالعه

گروه اول شامل ۱۵ ژنوتیپ بارلی، گروه دوم شامل ۱۵ ژنوتیپ گرمخانه‌ای و گروه‌های سه، چهار و پنج، به ترتیب شامل ۱۳، ۱ و ۱ فرد از تیپ شرقی شدند. آغازگرهای مورد استفاده توانستند ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را به خوبی از هم جدا کنند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۷۳/۳ درصد برآورد شد که نشان می‌دهد تابع تشخیص، تقسیم ژنوتیپ‌ها در پنج گروه به وسیله تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌کند (شکل ۳). بر اساس آغازگرهای بررسی شده، ژنوتیپ‌های S. 392- 35 و Perega، B104-1 و B16-10، Basma 178-2 و BS36، Coker 298 و Speight G. 28، Mutant 4(no4) و Izmir، Banket A1 و Burley semparant، Perega و Pereg 234، Speight G. 28 و Perega، Coker 298 و

www.SID.ir

Archive of SID

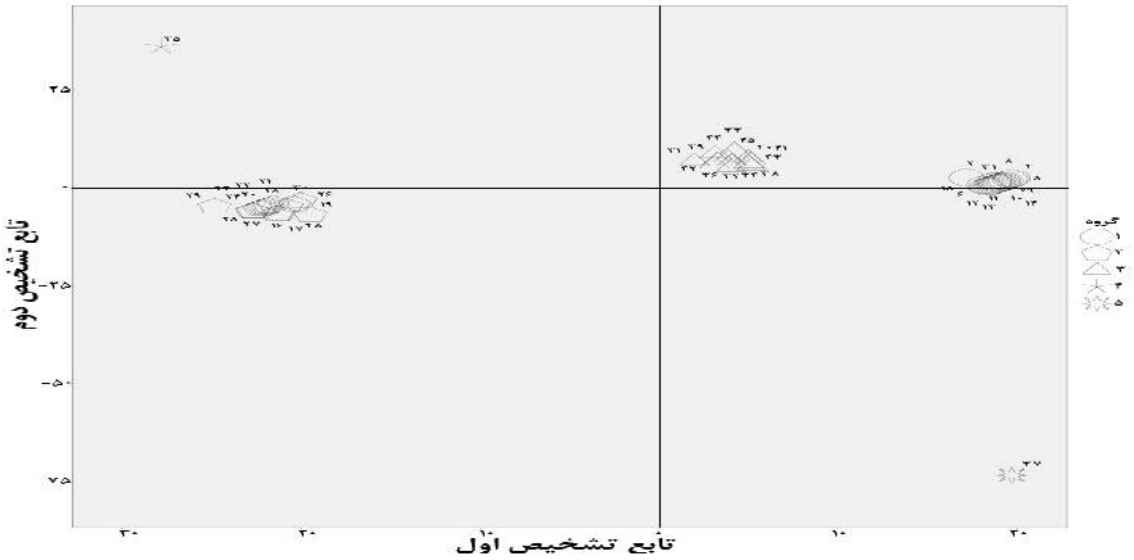
Perega، Bel 61-12 و Perega، S. 392-35 و Speight G. 28، S. 392-35 و Coker 298، Perega و K. S1. E، Coker 298 و N.2 به ترتیب با ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۹۵، ۰/۹۵، ۰/۹۴، ۰/۹۳، ۰/۹۳، ۰/۹۳، ۰/۹۳، ۰/۹۳، ۰/۹۳، ۰/۹۳، ۰/۹۲، ۰/۹۲ بیشترین شباهت مورد انتظار و ژنوتیپ‌های F.K.40-1 و Burley semparant، F.K.40-1 و Burley Ree103، F.K.40-1 وBurley A1، F.K.40-1 و Burley 151 به ترتیب با ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۴۳، ۰/۴۴، ۰/۴۵، ۰/۴۶ کمترین شباهت را دارا بودند. با توجه به مقادیر تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین ارقامی که کمترین تشابه را دارند، می‌تواند انجام گردد تا در برنامه‌های دورگ‌گیری جهت افزایش تنوع طبیعی استفاده شوند. تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان مکمل تجزیه خوشه‌ای، منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی خواهد شد (۷). میزان واریانس نسبی هر مؤلفه نشان دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل است و به‌صورت درصد بیان می‌شود. در این مطالعه نیز تجزیه به مختصات اصلی روی داده‌های حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP انجام شد و دو مؤلفه اول ۴۴/۳۹ درصد از کل واریانس را توجیه کردند. سهم دو مؤلفه اول به ترتیب برابر ۳۰/۳۳ و ۱۴/۰۶ درصد بود. نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس دو مؤلفه اول نشان داد که این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای تطابق دارد.

طبق نتایج به دست آمده، ژنوتیپ‌های F.K.40-1 و Burley semparant، F.K.40-1 و Burley Ree103، F.K.40-1 و Burley A1، F.K.40-1 و Burley 151 که بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده کمترین شباهت ژنتیکی را داشتند، در گروه‌بندی خوشه‌ای و نمودار به دست آمده از تجزیه به مختصات اصلی نیز در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند، همچنین تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی مطابق با روش تجزیه خوشه‌ای، از هم تفکیک شدند. ژنوتیپ‌هایی مانند S. 392-35 و Perega، B104-1 و B16-10، Basma 178-2 و BS36، Coker 298 و Speight G. 28، Mutant 4(no4) و Izmir کـه دارای بیشتریـن ضریب تشـابـه تطابـق ساده بودند نیز، با هم در یک گروه قرار گرفتند.

در تجزیه خوشه‌ای ۲۸ واریته توتون که از نشانگرهای مولکولی IRAP و ISSR استفاده شد، بر اساس نشانگر IRAP ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند که گروه سوم دربرگیرنده سه زیرگروه و سه نوع منحصر به‌فرد شد. همچنین با استفاده از نشانگر ISSR، ژنوتیپ‌ها به دو گروه و دو نوع منحصر به‌فرد (Coker176, BasmaUovina) تقسیم شدند (۱۸). همان‌طورکه در بررسی حاضر تیپ‌های مختلف توتون به خوبی از هم تفکیک شده و در گروه‌های مجزا قرار گرفتند، در پژوهشی که از نشانگرهای ISSR و IRAP جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۱۸ ژنوتیپ از تیپ‌های مختلف توتون شامل گرمخانه‌ای، آفتاب‌خشک، بارلی، شرقی و تیپ وحشی استفاده شد، روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به ۷ گروه تقسیم نمود، گروه اول شامل ۳ زیرگروه بارلی، شرقی و ژنوتیپ‌های وحشی شد، بیشتر ژنوتیپ‌های آفتاب خشک در گروه دو و سه توزیع شدند و ژنوتیپ‌های گرمخانه‌ای در گروه‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ قرار گرفتند (۲۰). در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از نشانگر AFLP، جدا کردن ارقام محلی از وارداتی با موفقیت انجام شد و ژنوتیپ‌ها در ۷ گروه قرارگرفتند (۱۲). به کارگیری روش‌های متعدد، جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت توتون با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشان داد که تنوع ژنتیکی در سطح ژنی به تدریج کاهش یافته است و تنها قسمتی از آلل‌های موجود در ذخیره ژنی، در ارقام زراعی توتون موجود است (۱۰)، در بررسی حاضر نیز تنوع نسبتاً کمی بین تیپ‌های مختلف توتون مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- گروه‌بندی تیپ‌های مختلف توتون مورد مطالعه بر اساس تابع تشخیص

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که استفاده از نشانگرهای IRAP و REMAP برای بررسی تنوع ژنتیکی تیپ‌های مختلف توتون مناسب می‌باشند. با توجه به اینکه آغازگرهای RTR-2، RTR-8، RTR-10، دارای مقادیر بالای PIC، تنوع ژنی نی و شاخص شانون بودند، می‌توانند به‌عنوان آغازگرهای مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند. مقدار شاخص ضریب تمایز ژنی بین تیپ‌های مورد مطالعه (۰/۳۲) نشان‌دهنده متمایز بودن تیپ‌های توتون و عدم شباهت ساختاری آنها بوده و توجیه ۶۸ درصدی از تنوع کل بر اساس تنوع درون تیپ‌ها، ناشی از تفاوت زیاد بین گیاهان و افراد درون تیپ‌ها می‌باشد. در نمودار الگوی تنوع نیز ژنوتیپ‌های مربوط به هریک از تیپ‌های بارلی، گرمخانه‌ای و شرقی در منطقه‌ای جداگانه متمرکز و به خوبی از هم تفکیک گردیدند. از آنجایی‌که اجرای هر برنامه اصلاحی متکی به وجود تنوع بوده، انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیس امری ضروری می‌باشد. بنابراین باید والدین دور از هم را که از گروه‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای هستند، انتخاب کرد. با افزایش فاصله ژنتیکی بین والدین، هتروزیس بیشتری به دست می‌آید، همچنین تنوع زیادی در نتاج حاصل از تلاقی در نسل‌های در حال تفرق ایجاد می‌شود که در برنامه‌های گزینش برای صفات مطلوب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹). با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه می‌توان از تنوع موجود در بین و درون تیپ‌ها در برنامه‌های اصلاح و گزینش توتون مانند گزینش ژنوتیپ‌های پرمحصول، تلاقی به‌منظور تولید نسل‌های درحال تفرق، تولید جمعیت‌های مناسب برای مکان‌یابی ژن‌های صفات کمی و غیره استفاده کرد.

منابع

1. Anderson, J.A., J.E. Church, S.D. Autrique, S. Thanksley and M.E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage map. Journal of Genome, 36: 181-188.
2. Anonymous. 2007. The SPSS system for Windows. Release 16.0.SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, USA.
3. Chen, X.J., B.C. Yang, B.G. Xiao and C.H. Shi. 2007. Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using inter simple sequence repeat and inter retrotransposon amplification polymorphism markers. Annals of Applied Biology, 150: 393-401.
4. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus, 12: 13-15.
5. Kalendar, R. and A.H. Schulman. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposone-based genotyping and fingerprinting. Nature Protocols, 1: 2478-2484.
6. Kumar, A. and J.L. Bennetzen. 1999. Plant retrotransposons. Annual Review of Genetics, 33: 479-532.
7. Messmer, M.M., A.A. Melchinger, J. Boppenmair, R.G. Hermann and E. Brunklaus-Jung. 1992. RFLP analysis of early-maturing European maize germplasm. I. Genetic diversity among flint and dent inbreds. Theoretical and Applied Genetic. 83: 1003 -1012.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Mohsenzadeh, M., H. Samizadeh Lahiji, A. Alami, M. Shoayi Deylami and S. Talesh Sasani. 2012. Study of Genetic diversity of flue-Cured tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) genotypes using ISSR and Retrotransposon markers. Iranian Journal of Field Crop Science, 43: 371-380. (In Persion)
9. Moghaddam, M., A. Mohammadi and M. Aghaie. 1994. Introduction to multivariate statistical method. Pishtaz Elm Press, Tabriz, 208 pp. (In Persion)
10. Moon, H.S., J.M. Nifong, J.S. Nicholson, J.S. Nicholson, A. Heineman, K. Lion, R. Van Der Hoeven, A. J. Hayes and R.S. Lewis. 2009. Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) gentic resources. Journal of Crop Science, 49: 1-11.
11. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 70: 3321-3323.
12. Piteekan, T., J. Denduangboripant and W. Suwanprasart. 2009. The 4th conference on science and technology for youth, 26- 37 pp.
13. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsattlite) markers for germplasm analysis. Journal of Molecular Breeding, 2: 225-238.
14. Ren, N. and M.P. Timko. 2001. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species. Journal of Genome, 44: 559-571.
15. Rohlf, F.J. 1998. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0) User Guide. Applied Biostatistics Inc, 3 Heritage Lane, Setauket, New York.
16. Russel, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, A. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accesssions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theoretical and Applied Genetic, 95: 714-722.
17. Siva Raju, K., M.S. Madhav, R.K. Sharma, T.G.K. Murthy and T. Mohapatra. 2008. Genetic polymorphism of Indian tobacco types as revealed by amplified fragment length polymorphism. Current Science, 94: 633-639.
18. Tao, A.F., Z.H. Liu, J.M. Qi, D.X. Zhou, T. Wang and S.H. Chen. 2009. Comparison and analysis of IRAP and ISSR molecular methods used for assessment of genetic diversity in tobacco. Journal of Wuhun Botanical Research, 27: 589-594.
19. VSN International. 2009. GenStat for Windows 12th Edition. VSN International, Hemel Hempstead, UK.
20. Yang, B.C., B.G. Xiao, X.J. Chenl and C.H. Shi. 2007. Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. Annals of Applied Biology, 150: 393.401.
21. Yeh, F.C. and R. Yang. 1999. Popgene Ver. 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis Quick User Guide. University of Alberta And Tim Boyle, Centre for International Forestry Research.
22. Zhang, H.Y., X.Z. Liu, C.S. He and Y.M. Yang. 2008. Genetic Diversity among flue-cured tobacco cultivars based on RAPD and AFLP markers. Brazilian Archives of Biology and Technology, 51: 1097-1101.

www.SID.ir

Archive of SID

Assessment of Genetic Diversity Among and Within Different Types of Tobacco (*Nicotianatabacum* L.) Using IRAP and REMAPMarkers

Seyedeh Fateme Hassani Tesie[1], HabibollahSamizadeh Lahiji[2] and MardavijShoaei Deilami[3]

1- M.Sc., University of Guilan
(Corresponding author: hassani_fateme_guilan@yahoo.com)
2-Associated Professor, University of Guilan
3- Instructor, of Guilan Tobacco Research Center
Received: January 10, 2013 Accepted: December 9, 2013

Abstract

In present study IRAP and REMAP markers were used to assess genetic diversity levels in 45 genotypes of different types of tobacco germplasm, including burley, flue-cured and oriental tobacco that out of 20 composition primers, 5 IRAP primersand 9 REMAP primers produced scorable and polymorphic banding patterns. Totally from 188 amplified loci, 153 loci were polymorph. RTR-10 and RTR-1 with 22 and 16 bands andUBC817+RTR-1 with 4 bands had the maximum and minimum polymorphic bands, respectively. In overall studied genotypes, PIC value varied between 0.16 to 0.33 and MI between 0.34 to 6.25. Cluster analysis using UPGMA method, 45 genotypes were placed in five cluster groups. GroupsI, II and III to V including burley type, flue-cured tobacco and oriental tobacco genotypes, respectively.Canonical Discriminate Function via Fisher's linear method was ableto confirm 73.3 percent of the validity of clustering analysis result.

Keywords: Retrotransposon, Simple Matching Coefficient, Polymorphism InformationContect

www.SID.ir